

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
13 de Octubre de 2005 (13.10.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/094790 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: **A61K 9/127**

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/000171

(22) Fecha de presentación internacional:
1 de Abril de 2005 (01.04.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200400826 2 de Abril de 2004 (02.04.2004) ES
P200402862
26 de Noviembre de 2004 (26.11.2004) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): **ITALFARMACO, S.A.** [ES/ES]; C/ San Rafael, 3,
E-28108 Alcobendas (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
CHANTRES ANTORANZ, José Ramón [ES/ES];
C/ Puerto de Canencia, 14-3^ºB, E-28220 Majadahonda
(ES). **MOSCOSO DEL PRADO, Jaime** [ES/ES]; C/
San Rafael, 3, E-28108 Alcobendas (ES). **ELORZA
BARROETA, María Ángeles** [ES/ES]; Universidad
Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, Dpto.de
Química-Física II, Plaza de Ramón y Cajal, s/n, E-28040
Madrid (ES). **ELORZA BARROETA, Begoña** [ES/ES];
Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farma-
cia, Dpto.de Química-Física II, Plaza de Ramón y Cajal,
s/n, E-28040 Madrid (ES). **CÓRDOBA DÍAZ, Manuel**
[ES/ES]; Universidad Complutense de Madrid, Facultad
de Farmacia, Dpto.de Química-Física II, Plaza de Ramón
y Cajal, s/n, E-28040 Madrid (ES).

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: LIPOSOMAL FORMULATIONS

(54) Título: FORMULACIONES LIPOSOMALES

PHOTOGRAPH OF LIPOSOMES DSPC:DSPG IN HYDROXYETHYLCELLULOSE GEL

Fotografía de liposomas DSPC:DSPG en gel de hidroxietilcelulosa



(57) Abstract: The invention relates to formulations of hydrophilic substances that are encapsulated in liposomes, the method of encapsulating the hydrophilic substances in liposomes, and the use of said formulations in the prevention and/or treatment of human or animal diseases and/or disorders.

[Continúa en la página siguiente]

WO 2005/094790 A1



(74) **Mandatarios:** DE JUSTO V., Jorge etc.; c/o Jacobacci & Partners, M. & J. De Justo, Castellana 128, E-28046 Madrid (ES).

(81) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados designados** (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) **Resumen:** La invención se refiere a formulaciones de sustancias hidrofílicas encapsuladas en liposomas, al método de encapsulación de las sustancias hidrofílicas en los liposomas y al uso de dichas formulaciones en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y/o trastornos del ser humano o animal.

FORMULACIONES LIPOSOMALES

La invención se refiere a formulaciones de sustancias hidrofílicas encapsuladas en liposomas, al método de encapsulación de las sustancias hidrofílicas en los liposomas y al uso de dichas formulaciones en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y/o trastornos del ser humano o animal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los liposomas son vesículas microscópicas que poseen una cavidad central acuosa rodeada por una membrana lipídica formada por bicapa(s) concéntrica(s).

Los liposomas pueden ser unilamelares (es decir tener una única bicapa lipídica) u oligolamelares o multilamelares (si tienen varias bicapas). Las vesículas multilamelares (MLVs) tienen un tamaño que va desde 0,2 μm a 10 μm mientras que las unilamelares pueden ser grandes (LUVs) o pequeñas (SUVs) con un tamaño entre 0,02 y 0,2 μm .

Por su estructura tienen capacidad de incorporar sustancias hidrofílicas (en el interior acuoso) o hidrofóbicas (en la membrana lipídica).

Los componentes estructurales más importantes de los liposomas son los fosfolípidos (PLs).

Para obtener liposomas con propiedades específicas se pueden utilizar fosfolípidos con carga neutra, positiva o negativa y/o con diferente longitud y grado de saturación de las cadenas de ácidos grasos.

Asimismo, para modificar las propiedades de los liposomas se puede, por ejemplo, incorporar colesterol (COL) u otros lípidos a la membrana, modificar el número de bicapas lipídicas o unir covalentemente moléculas naturales (por ejemplo proteínas, polisacáridos, glicolípidos, anticuerpos, enzimas) o sintéticas (por ejemplo polietilenglicol) a su superficie.

En suma, las variables a considerar en el momento de diseñar un liposoma son múltiples y los resultados no son siempre los esperados.

Como vehículos para la administración de fármacos, los liposomas tienen, en teoría, numerosas ventajas. Además de estar constituidos por componentes no tóxicos, generalmente no inmunogénicos, no irritantes y biodegradables, deberían ser capaces

de encapsular, retener, transportar y ceder a órganos diana una gran variedad de agentes terapéuticos, reduciendo sus efectos secundarios adversos.

Sin embargo, el objetivo de desarrollar formulaciones liposomales óptimas desde el punto de vista técnico y terapéutico es alcanzado en contadas ocasiones.

5

En particular, las vesículas liposomales óptimas deben:

- encapsular el agente activo en su interior en un porcentaje elevado, de modo que la eficacia de encapsulación (relación entre cantidad de fármaco encapsulado y lípido) sea adecuada desde el punto de vista de la dosificación y del costo de la formulación;
- ser estables, es decir retener el agente activo encapsulado durante la vida útil de la formulación y, una vez administradas al paciente, alcanzar el sitio de acción;
- liberar el fármaco en el sitio de acción con un perfil de cesión adecuado al objetivo terapéutico, reduciendo la toxicidad sistémica.

10

15

Por otra parte, y en el caso específico de administración tópica, los lípidos que forman las vesículas liposomales deben conferir ciertas propiedades a la bicapa lipídica de modo que los liposomas resultantes promuevan la rápida penetración del principio activo a través del stratum corneum y su localización en el sitio de acción deseado (normalmente en las proximidades de la capa basal de la epidermis).

20

Si bien en estudios previos se ha conseguido encapsular sustancias hidrofílicas (de bajo peso molecular y carácter polar) en liposomas, la retención del agente activo en el interior de los mismos continúa siendo un problema técnico a solucionar como queda demostrado en los siguientes trabajos.

25

Simmons SP, Kramer PA. [*J Pharm Sci* 66: 984-986 (1977)], utilizando liposomas multilamelares compuestos por esfingomielina, colesterol y dicetil-fosfato encuentran que, al cabo de 40 horas a 25°C, únicamente 20% de 5-FU inicialmente encapsulado se mantiene en el interior de los liposomas.

30

Tsukada K, Ueda S, Okada R. [*Chem. Pharm. Bull.* 32: 1912-1935 (1984)], empleando liposomas compuestos por DSPC encuentran que, seis horas después de su preparación, se ha producido una salida de 5-FU del interior de las vesículas de 50% y 10%, respectivamente, a 37 y 25°C.

35

Özer AY [*Drug Target. Deliv.* 1: 15-160 (1992)], estudia el comportamiento de liposomas tipo OLV de dos composiciones: a) lecitina de soja : hemisuccinato de colesterol : colesterol (10:1:4) y b) DPPC : hemisuccinato de colesterol: colesterol

(10:1:4). La capacidad de retención del fármaco que refieren es reducida, pero depende de la formulación probada. En los liposomas tipo a) únicamente 10% de 5-FU permanece retenido en su interior después de 28 días a temperatura ambiente. En los liposomas tipo b) 40% de 5-FU sale en 42 días a temperatura ambiente.

5 Fresta M, Villari A, Publisi G, Cavallaro G [*Int. J. Pharm.* 99:145-156 (1993)], empleando liposomas de diferente tamaño y distintas composiciones estudian su capacidad de retención durante 7 horas a 37 °C. Según tipo y composición de los mismos, encuentran que en ese espacio de tiempo sale de los liposomas entre 15% y 35% de 5-FU inicialmente retenido.

10 Por su parte, Elorza B, Elorza MA, Frutos G, Chantres JR. [*BBA 1153: 135-142 (1993).*], utilizando liposomas LUV con dos composiciones diferentes constituidas por DSPC y esfingomielina, respectivamente, estudian la salida de 5-FU de su interior durante 60 minutos. En ese tiempo, más de 75% sale de los liposomas de DSPC y entre 12 y 25 % de los de SM.

15 El Maghraby GMM, Williams AC, Barry BW. *J Pharm Pharmacol* 53: 1069-1077 (2001), empleando liposomas LUV con tres composiciones diferentes: SPC; SPC:Coolesterol. (1:1) y SPC:Colato (84:16), encuentran una rápida salida de 5-FU (más de 50% a los 50 minutos), a pesar de encontrarse suspendidos en una solución saturada de 5-FU. Por otra parte, al suspender liposomas compuestos por SPC:Colato
20 en una solución sin 5-FU, una salida de 80% de 5- FU inicialmente encapsulado a los 5 minutos.

Finalmente, Mayer LD, Bally MB, Cullis PR, Ginsberg RS, Mitilenes GN, US Patent 6.083.530 (2000) plantean resolver dos problemas conocidos: aumentar la encapsulación y conseguir que drogas antineoplásicas permanezcan retenidas en los
25 liposomas. Usan diferentes composiciones con y sin coolesterol. Las vesículas son de tipo LUV y los fármacos son cargados activamente mediante gradiente de pH. De esta manera obtienen alto porcentaje de encapsulación y logran retener el principio activo en el interior de los liposomas. No obstante, al eliminar el gradiente de pH la salida de la droga es inmediata. Entre los ejemplos que presentan este
30 comportamiento se encuentra una formulación de 5-FU.

Norley S.G. et al., [*J.Immunol.* 136 : 681-685 (1986)], utilizando liposomas neutros compuestos por fosfatidilcolina (PC) de huevo y coolesterol 15:1 preparados por el método deshidratación-rehidratación (DRV), obtienen una retención de 44% de aciclovir al cabo de 14 días a 4 °C y de 48 % luego de 24 horas a 37 °C.

35 Law S.L. et al., [*Int.J.Pharm.* 161 :253-259 (1998)], empleando liposomas MLV de PC de huevo y coolesterol 1,6:1, neutros y cargados mediante adición de dicetilfosfato

o estearilamina en relaciones molares entre 0,15 y 1,6, logran a las 10 horas a 37 °C una retención de aciclovir entre 75 % y menos de 25 % (según la cantidad de carga) para los de carga positiva, entre 90 % y 35 % (según la cantidad de carga) para los de carga negativa y entre 80 % y 60 % para los neutros.

5 Fresta M. et al., [J.Parm.Pharmacol.51 :565-576 (1999)] utilizando liposomas compuestos por DPPC:COL 7:4 (neutros rígidos), DPPC:COL 7:4:1 (carga negativa rígidos) y DPPC:Colesterol:DDAB 7:4:1 (carga positiva rígidos), obtienen una retención de aciclovir entre 50 y 30 % a las 8 horas a 37°C para los OLV (con mínimas retenciones para neutros y negativos) y entre 65 % y 45 % a las 8 horas a 37
10 °C para los MLV (con mínimas retenciones para neutros y negativos).

Sarbolouki MN, Toliat T. PDA, [J Pharm Sci Technol 52: 23-27 (1998)] empleando liposomas compuestos por EPC (flexibles, neutros), de tamaño MLV y REV, consiguen una retención de metotrexato a los 30 días de 70% a 4°C; 40% a 25°C y <10 % a 37°C.

15 Khopade AJ, et al. [Int. J. Pharm. 232: 157-162 (2002)] utilizando liposomas MLV constituidos por HSPC:COL (neutros, rígidos) y HSPC:COL:DCP (negativos, rígidos), obtienen una retención de metotrexato de 35% a las 8 horas a 37°C.

Norley SG, et.al., [J. Immunol 136: 681-685 (1986)] empleando liposomas compuestos por PC de huevo (poliinsaturada, flexible) y colesterol 15:1 (neutros),
20 preparados por el método DRV, consiguen una retención de iododeoxiuridina de 50% a las 24 horas a 4°C y 20% a la hora a 37 °C.

Simmons SP, Kramer PA., [J Pharm Sci 66: 984-986 (1977)] utilizando liposomas MLV constituidos por esfingomielina (SM):COL:DCP 4.8:2.8:1 (negativos), obtienen una retención de floxuridina de 70% a las 40 horas a 25°C

25 Maurer N. et al., [BBA 1374: 9-20 (1998)] empleando liposomas LUV compuestos por DPPC:COL 55:45 (neutros, rígidos), logran una retención de ciprofloxacino de 20% a los 30 min a 25°C.

En suma, si bien se ha logrado encapsular agentes activos hidrofílicos en liposomas permanece el problema de que éstos sean estables, es decir que retengan el principio
30 activo en su interior.

RESUMEN DE LA INVENCION

35 Existe por lo tanto la necesidad de disponer de formulaciones farmacéuticas de principios activos hidrófilos encapsulados en liposomas que tengan alta eficacia de encapsulación, sean estables y posean un perfil de cesión del fármaco adecuado al

objetivo terapéutico y no tóxico para el paciente.

Los inventores de la presente han encontrado que el empleo de una mezcla de fosfolípidos saturados neutros y de lípidos saturados con carga en la preparación de liposomas permite alcanzar estos objetivos.

5 Es así que han logrado obtener formulaciones estables de fármacos hidrofílicos, en las que el principio activo permanece eficazmente encapsulado en el interior de los liposomas durante el tiempo necesario para la preparación, almacenamiento y distribución de las correspondientes formulaciones farmacéuticas hasta la administración al paciente.

10

Asimismo, y para el caso específico de la aplicación tópica, han conseguido que dichas formulaciones tengan una buena difusión en piel, alcanzando la epidermis y teniendo allí un efecto depot, y no manifiesten signos de toxicidad (irritación cutánea) tras su aplicación dérmica reiterada. Cabe esperar que también muestren buena difusión en mucosas.

15

En consecuencia, el uso de una combinación de PLs saturados neutros y lípidos saturados con carga permite obtener composiciones tópicas de fármacos hidrofílicos y bajo peso molecular encapsulados en liposomas que tienen alta estabilidad, eficacia terapéutica (basada en una buena difusión cutánea del fármaco) y seguridad (debida a una baja absorción sistémica).

20

Por otra parte, el empleo de una mezcla de PLs saturados neutros y lípidos saturados con carga permitiría encapsular en liposomas no solo fármacos sino también otras sustancias hidrofílicas tales como agentes diagnósticos, cosméticos, sustancias alimenticias, etc, de manera eficaz y estable.

25

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a formulaciones liposomales que comprenden al menos un agente activo hidrofílico encapsulado en liposomas constituidos por una o varias bicapas lipídicas formadas por una mezcla de al menos un fosfolípido saturado neutro y al menos un lípido saturado con carga.

30

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de encapsulación de sustancias activas hidrofílicas en los liposomas, es decir, al método de preparación de dichas formulaciones liposomales.

35

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere al uso de las mencionadas formulaciones liposomales en la preparación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de patologías o condiciones del ser humano o animal.

5

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a las formulaciones farmacéuticas o veterinarias que contienen dichas formulaciones liposomales y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 Previo a la descripción de las realizaciones particulares, cabe definir algunos términos específicos vinculados a los aspectos principales de la presente invención, con fines aclaratorios, no limitativos.

15 Se entiende por “formulaciones liposomales” aquellas en la que parte o todo el principio activo se encuentra encapsulado en el interior de liposomas.

Los liposomas pueden estar constituidos por una o varias bicapas de lípidos y tener diferente tamaño.

Las bicapas tienen superficie polar (interior y exterior) y núcleo no polar.

20 Se entiende por “fosfolípido” a aquel derivado anfifílico del glicerol en el que uno de sus grupos hidroxilo está esterificado con ácido fosfórico y los otros dos hidroxilos están esterificados con ácidos grasos de cadena larga, que pueden ser iguales o diferentes entre sí.

25 Un fosfolípido saturado será aquel cuyos ácidos grasos sólo tienen enlaces carbono-carbono sencillos (no múltiples).

Un fosfolípido neutro será generalmente aquel en el que otro hidroxilo del ácido fosfórico está esterificado por un alcohol sustituido con un grupo polar (habitualmente hidroxilo o amino) y cuya carga neta es cero.

30 Un fosfolípido con carga será generalmente aquel en el que otro hidroxilo del ácido fosfórico está esterificado por un alcohol sustituido por un grupo polar y cuya carga neta es positiva o negativa.

35 Se entiende que la expresión “lípidos saturados con carga”, además de incluir a los fosfolípidos saturados con carga, comprende a otros compuestos anfifílicos cuya carga neta es distinta de cero, tales como derivados hidrocarbonados de cadena larga, sustituidos por un grupo polar (por ejemplo amino) y derivados de ácidos grasos.

En el contexto de la presente invención, se consideran fármacos hidrofílicos aquellos que exhiben un log Pow (logaritmo decimal del coeficiente de reparto octanol/agua) menor de cero.

Asimismo, se consideran fármacos de bajo peso molecular aquellos que poseen un
5 peso molecular inferior a 1000 Da.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 En principio, cualquier PL saturado neutro y cualquier lípido saturado con carga, naturales o sintéticos, pueden ser utilizados en las formulaciones liposomales de la presente invención.

En una realización preferida, el PL saturado neutro es elegido del grupo formado por derivados de fosfatidilcolina y sus mezclas, por ejemplo dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) y
15 sus mezclas.

En otra realización preferida, el PL saturado con carga tiene carga negativa y es seleccionado del grupo formado por derivados de fosfatidilglicerol, dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfático y sus mezclas, por ejemplo, diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG) y una
20 mezcla de ésteres de fosfatidilserina con diferentes ácidos grasos saturados (PS) (por ejemplo PS de cerebro bovino).

25 En otra realización preferida, el lípido saturado con carga tiene carga positiva y es estearilamina (SA).

En principio, cualquier relación entre PL neutros y lípidos con carga puede ser utilizada en las formulaciones de esta invención.

30 En una realización preferida, la relación molar PL neutros / lípidos con carga estará entre 50/50 y 95/5, preferentemente entre 80/20 y 95/5.

Las formulaciones liposomales proporcionadas por esta invención pueden además contener otros componentes lipídicos como esteroides y derivados (por ejemplo
35 colesterol) o esfingolípidos (por ejemplo esfingomielinas y glicoesfingolípidos, en particular gangliósidos).

Cualquier sustancia hidrofílica podría ser encapsulada en las formulaciones liposomales de esta invención. Preferiblemente, dicha sustancia es un fármaco.

En principio, cualquier fármaco hidrofílico puede ser encapsulado en los liposomas de la presente invención. En el caso de formulaciones liposomales de aplicación tópica, el fármaco hidrofílico es preferiblemente de bajo peso molecular.

En realizaciones preferidas, el agente farmacológicamente activo es seleccionado entre aciclovir (ACV), iododeoxiuridina (IDUR), metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU) y ciprofloxacino.

En una realización preferida, la relación molar fármaco hidrofílico / lípidos estará entre 0,01/1 y 40/1, más preferiblemente estará entre 0,1/1 y 2/1.

El límite inferior viene determinado por la menor cantidad de fármaco que resulte práctica para hacer liposomas dado su pretendido uso y puede ser fácilmente determinado por un experto en la materia. El límite superior está condicionado por la concentración de cristalización del fármaco.

Formulaciones de 5-FU liposomal particularmente preferidas son aquellas en las que los liposomas están constituidos por la mezcla de fosfolípidos DSPC:DSPG y DSPC:PS, con una relación PL neutro / PL con carga entre 85/15 y 95/5. En estas formulaciones la relación molar 5-FU / lípidos puede estar entre 0,2 y 1,5, preferentemente estará entre 0,5 y 1,0.

Formulaciones de ACV liposomal particularmente preferidas son aquellas en las que los liposomas están formados por DSPC:DSPG y DPPC:COL:DPPG.

Fármacos, PLs y demás componentes de las formulaciones de la presente invención son conocidos por un experto en la materia y pueden ser obtenidos de fuentes comerciales. Por ejemplo, DSPG y DSPC fueron obtenidos de Chemi S.p.A., PS de cerebro bovino y 5-FU de Sigma.

Las formulaciones liposomales de la presente invención pueden ser preparadas por cualquiera de los métodos conocidos por un experto en la materia.

El tamaño de los liposomas resultantes va a depender del método de preparación empleado. En una realización preferida los liposomas son preparados de acuerdo al método expuesto en los Ejemplos 1, 4, 6 y 11.

Los liposomas resultantes pueden ser deshidratados (lío­filizados) para su posterior formulación y/o almacenamiento y distribución.

Asimismo, los liposomas pueden mantenerse en suspensión en una solución acuosa que contiene o no fármaco. En el primer caso, la suspensión resultante contendrá parte del fármaco encapsulado en el interior de los liposomas y parte en el exterior de los mismos.

En el caso de las formulaciones de 5-FU liposomal de administración tópica son preferidas aquellas que tienen parte del principio activo en fase externa, tales como las descritas en los Ejemplos 4 y 5. En estas formulaciones, el porcentaje en peso de 5-FU encapsulado en el interior de los liposomas respecto a la cantidad de 5-FU total estará entre 20% y 100%, preferentemente entre 35% y 55%.

Las formulaciones liposomales proporcionadas por esta invención van a ser particularmente útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos del ser humano o animal.

Las presentes formulaciones liposomales han demostrado ser particularmente útiles y ventajosas en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos de piel y/o mucosas.

Particularmente, las formulaciones de 5-FU liposomal de acuerdo a la presente invención van a ser útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas o veterinarias para el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con hiperproliferación celular, por ejemplo distintos tipos de cáncer, condiciones precancerosas u otras patologías del ser humano o animal.

Los distintos tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, colorectal, gástrico, pancreático, de vejiga urinaria, de próstata, de cabeza y cuello, de ovario, cervical, endometrial, hepático, de pulmón, carcinoma de células basales superficiales, etc.

Las lesiones precancerosas incluyen, por ejemplo, queratosis actínica, displasia cervical, etc.

Otras patologías asociadas a hiperproliferación celular incluyen, a modo de ejemplo, psoriasis, condiloma cuminado, etc.

Las formulaciones de 5-FU liposomal proporcionadas por esta invención han demostrado ser particularmente útiles y ventajosas en tratamientos por vía tópica de enfermedades o trastornos hiperproliferativos de piel y/o mucosas tales como queratosis actínica y psoriasis.

Por otra parte, las formulaciones de ACV liposomal de la presente invención son útiles en tratamientos por vía tópica de infecciones causadas por el virus del herpes en piel y/o mucosas, en particular en el tratamiento de herpes cutáneo.

Preferiblemente, las formulaciones liposomales de la presente invención se administrarán en un vehículo farmacéuticamente aceptable, que va a estar constituido por al menos un excipiente. Dicho excipiente puede ser seleccionado entre cualquiera de los conocidos por un experto en la materia y de acuerdo con la vía de administración a emplear, la que dependerá del objetivo terapéutico buscado.

Para la administración parenteral, el vehículo suele estar constituido por agua y sustancias auxiliares requeridas para hacerlo compatible con las condiciones fisiológicas tales como agentes reguladores de pH, de tonicidad, etc. La solución acuosa resultante puede ser esterilizada por métodos convencionales y envasada para su uso, o filtrada y liofilizada, lo que puede requerir el uso de agentes crioprotectores. El material liofilizado será combinado con una solución acuosa estéril previo a su administración.

Para la administración tópica, el vehículo va a estar constituido por excipientes seleccionados de acuerdo con la forma farmacéutica que se pretenda en cada caso, preferiblemente líquida o semisólida. Las formulaciones líquidas incluyen soluciones acuosas, soluciones hidroalcohólicas, lociones, etc. Las formulaciones semisólidas pueden ser pomadas, cremas o geles. Cualquiera de estas formulaciones puede requerir el empleo de conservantes, agentes antioxidantes, quelantes, emulsionantes, sistemas reguladores de pH, sustancias reguladoras de tonicidad, conservantes, polímeros bioadhesivos, sustancias gelificantes, etc.

El agente conservante puede ser seleccionado entre, por ejemplo, benzoato de sodio, ácido ascórbico, parabenos, bronopol, metilisotiazolinona y sus mezclas. El antioxidante puede ser elegido, a modo de ejemplo, entre hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol y tocoferol y sus derivados. El agente quelante puede ser seleccionado, por ejemplo, del grupo formado por ácido etilendiaminotetraacético

(EDTA), ácido etilenglicol bis-(2aminoetil)-tetraacético (EGTA) y ácido cítrico o sus sales. El sistema regulador de pH puede ser elegido, a modo de ejemplo, entre una solución tampón fosfato y una solución tampón citrato. El agente gelificante puede ser seleccionado, por ejemplo, entre Carbopoles, Poloxameros, carboximetilcelulosa (CMC), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC), metilcelulosa (MC) y sus mezclas.

En una realización particularmente preferida, las composiciones farmacéuticas o veterinarias de la presente invención se formularán para administración por vía tópica, en piel o mucosas.

Las dosis de agente farmacológicamente activo a administrar al paciente va a depender de la indicación terapéutica de la formulación, de la respuesta del paciente al tratamiento y de la terapia concomitante.

ENSAYOS

Las propiedades inesperadas y ventajosas de las formulaciones de la presente invención se manifiestan a través los siguientes ensayos “in-vitro” e “in-vivo” no limitativos.

A- PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN Y ENSAYOS DE ESTABILIDAD

Ejemplo 1: Encapsulación de 5-FU en liposomas de composición DSPC:DSPG, sin 5-FU en fase externa.

Se añaden a un matraz de rotavapor 384 mg de DSPC, 43 mg de DSPG, 4,5 g de perlas de vidrio, y 9 ml de una mezcla cloroformo:metanol en una relación 2:1 v/v. Una vez disueltos los lípidos en la mezcla de solventes, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40°C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente se reduce la presión 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata agitando con 9 ml de una solución acuosa de 5-FU (50 mg/ml, pH 8,8) a 65°C durante 1 hora. Posteriormente se mantiene en agitación una hora adicional a 30°C.

La suspensión liposómica formada se extruye a través de filtros de policarbonato de 2 μm de poro para homogeneizar el tamaño de las vesículas formadas. Finalmente, la suspensión resultante se diafiltra frente a 6 volúmenes de un tampón fosfato salino (pH 6; 600 mOsmol/Kg) para eliminar el 5-FU no encapsulado, utilizando para ello
5 membranas Vivaflow 50 con un corte de 100KD (Sartorius). Los liposomas resultantes se diluyen con el mismo tampón, se alicuotan en viales de polipropileno y se almacenan a 25°C hasta su análisis.

10 Para determinar el 5-FU total presente en la suspensión liposómica se diluye previamente esta suspensión en metanol para disolver los lípidos de la membrana liposómica y liberar su contenido. La concentración de 5-FU se determina posteriormente mediante espectroscopia a 266 nm frente a una curva de calibración.

15 Para determinar el fluorouracilo encapsulado, se sedimentan previamente los liposomas mediante centrifugación durante 25 minutos a 26.000 g, recogiendo el sobrenadante. Posteriormente se analiza el contenido de 5-FU en el sobrenadante por el procedimiento anteriormente descrito.

20 La diferencia entre el 5-FU total y el presente en el sobrenadante representa la fracción encapsulada. En el ejemplo descrito, la concentración de 5-FU total se ajustó a 0,800 mg/ml, estando un 95,5% del mismo encapsulado en el interior de los liposomas al comienzo del estudio. La relación molar 5-FU/lípido fue de 0,82.

La Figura 1 muestra la evolución del porcentaje de 5-FU encapsulado (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de un total de 6 meses a 25°C. Se observa una caída inicial del porcentaje de 5-FU encapsulado, que se estabiliza posteriormente en el 67% (I.C. 95% = 61 – 73). Se comprueba así que empleando una combinación de PLs saturados neutros y saturados con carga se obtienen formulaciones liposomales estables de 5-FU.
25

30

Ejemplo 2: Encapsulación de 5-FU en liposomas de composición DSPC:PS, sin 5-FU en fase externa.

Se realiza de forma análoga al ejemplo pero sustituyendo DSPG por PS como fosfolípido cargado negativamente. En este caso, la concentración de 5-FU total se
35

ajustó a 0,600 mg/ml, con un 96,5 % encapsulado inicialmente y una relación molar 5-FU/lípido de 0,7.

5 La Figura 2 muestra la evolución del porcentaje de encapsulación (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de un total de 6 meses a 25 °C. La cinética es similar a la observada en el ejemplo anterior, estabilizándose en el 71% de 5-FU encapsulado (C.I. 95% = 66 – 75).

10 **Ejemplo 3:** Encapsulación de 5-FU en liposomas de composición DSPC:DSPG con eliminación parcial de 5-FU de fase externa.

Se procede de manera análoga al ejemplo 1 pero realizando la diafiltración únicamente frente a 3 volúmenes de tampón, de forma que no se elimina completamente el 5-FU no encapsulado. La suspensión de liposomas se diluye hasta 15 una concentración de 5-FU total de 3,41 mg/ml, el 71% del cual está encapsulado en el interior de los liposomas, con una relación molar 5-FU/lípido de 1,5.

El seguimiento de la estabilidad se realiza durante dos meses a 25 °C. Los resultados se muestran en la Figura 3. En estas condiciones no se detecta ninguna caída 20 significativa en el porcentaje de encapsulación en el tiempo estudiado.

Ejemplo 4: Encapsulación de 5-FU en liposomas de composición DSPC:DSPG sin eliminación de 5-FU de fase externa.

25 Se añaden a un matraz de rotavapor 14,0 g de DSPC, 1,55 g de DSPG, 30 g de perlas de vidrio y 60 ml de una mezcla de Cloroformo:metanol 2/1 en volumen.

Una vez disueltos los lípidos, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40°C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 30 mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente se reduce la presión 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata agitando con 60 ml de una solución de 30 mg/ml de 5-FU en tampón citrato 10 mM, pH 6 35 precalentada a 65°C durante 1 hora. A continuación, y manteniendo la temperatura a 65 °C, la suspensión resultante se homogeniza utilizando un Ultraturrax T-25 (IKA), durante 15 minutos a 6500 rpm. Posteriormente la suspensión liposómica se diluye

con tampón citrato salino (300 mOsmol/Kg) hasta una concentración aproximada de 12 mg/ml de 5-FU y se mantiene en agitación una hora adicional a temperatura ambiente. La suspensión resultante se alícuota y almacena a 25 °C hasta su análisis.

5 La cuantificación de 5-FU se realiza de forma análoga a lo ejemplos anteriores. La determinación del porcentaje de encapsulación se realiza eliminando previamente el 5-FU no encapsulado por cromatografía de exclusión en columnas de Sephadex G-50 (PD-10, Amersham) y midiendo el 5-FU en la fracción liposómica, correspondiente al volumen de exclusión de la columna. En este caso la preparación liposómica tiene
10 una concentración de 5-FU total de 11,6 mg/ml, encontrándose el 36% encapsulado inicialmente, con una relación molar 5-FU/lípido de 0,7.

En la Figura 4 se muestran los resultados del seguimiento de la encapsulación a lo largo de 70 días a 25 °C, no observándose ninguna caída significativa.

15

Ejemplo 5: Encapsulación de 5-FU en liposomas de composición DSPC:DSPG sin eliminación de 5-FU de fase externa.

Se procede de forma análoga al ejemplo 4, sustituyendo el tampón citrato por tampón
20 fosfato salino 10 mM, pH 6,2. La suspensión producida tiene 12,5 mg/ml de 5-FU total, el 41% del cual se encuentra encapsulado en liposomas, con una relación molar 5-FU/lípido de 0,68.

En la figura 5 se muestran los resultados del seguimiento de la encapsulación a lo
25 largo de 4 meses a 25°C, no observándose ningún descenso significativo.

Ejemplo 6: Encapsulación de ACV en liposomas MLV de composición DSPC:DSPG.

30 Se añaden a un matraz de rotavapor DSPC y DSPG en una relación molar 9:1 y cloroformo: metanol en una relación 2:1 v/v. Una vez disueltos los lípidos en la mezcla de solventes, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40 °C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente, se reduce la
35 presión a 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata por agitación con 9

ml de una solución acuosa de ACV sódico (50 mg/ml) a 65°C durante 1 hora en el rotavapor.

5 Los liposomas multilamelares así obtenidos se procesan mediante extrusión a través de membranas de policarbonato con poros de 2,0 µm. A continuación el ACV no encapsulado se elimina por diafiltración, primero frente a tres volúmenes de una solución de NaCl 150 mM, pH 11,5 y a continuación frente a 5-6 volúmenes de tampón fosfato 10 mM pH 6,0, NaCl 150 mM, utilizando membranas Vivaflow 50 con un corte de 100KD (Sartorius). Los liposomas resultantes se diluyen con el
10 mismo tampón, la solución se fracciona en alícuotas que se almacenan en viales de polipropileno a 25 °C hasta su análisis.

Para determinar el ACV total presente en la suspensión liposómica, primero se deben disolver los lípidos de la membrana liposómica y liberar su contenido mediante
15 dilución de la suspensión en metanol. Luego se determina la concentración de ACV mediante espectroscopia a 254 nm frente a una curva de calibración.

Para determinar el ACV encapsulado, se sedimentan previamente los liposomas mediante centrifugación durante 25 minutos a 26.000 g, recogiendo el sobrenadante.
20 Posteriormente se analiza el contenido de ACV en el sobrenadante por el procedimiento anteriormente descrito.

La diferencia entre el ACV total y el presente en el sobrenadante representa la fracción encapsulada. La concentración de ACV total se ajustó a 0,555 mg/ml, estando un 96,3% del mismo encapsulado en el interior de los liposomas al comienzo
25 del estudio. La relación molar ACV/lípido fue de 0,83.

La Figura 6 muestra la evolución del porcentaje de ACV encapsulado (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de 4 meses a 25°C , no detectándose ninguna caída significativa. En consecuencia, se confirma que empleando una combinación
30 de PLs saturados neutros y saturados con carga se obtienen formulaciones liposomales estables de ACV.

Ejemplo 7: Encapsulación de ACV en liposomas LUV de composición DPPC:COL:DPPG.

Se añaden a un matraz de rotavapor DPPC, DPPG y COL en relación molar 60:10:40 y cloroformo:metanol en relación 2:1 v/v y se repite el procedimiento del Ejemplo 6. La película de lípidos formada se hidrata agitando con 9 ml de una solución acuosa de ACV sódico (50 mg/ml) a 55°C durante 1 hora en el rotavapor.

- 5 Los liposomas así obtenidos se procesan de forma análoga al Ejemplo 6, salvo que la extrusión se realiza a través de membranas con poros de 0,2 µm.

- 10 La determinación de ACV total y encapsulado se realiza por el mismo procedimiento que el ejemplo 6. Los liposomas resultantes exhiben una relación molar ACV/lípido de 0,52, estando un 98,4% del ACV encapsulado en el interior de los liposomas. No se detectó variación en el porcentaje de ACV encapsulado a lo largo de un total de 6 semanas a 25°C.

- 15 **Ejemplo 8:** Encapsulación de ACV en liposomas LUV compuestos por palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC).

Se preparan liposomas según lo descrito en el Ejemplo 7, sustituyendo los lípidos por POPC.

- 20 La determinación de ACV encapsulado se realiza siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 7, comprobándose que utilizando un PL neutro pero insaturado, únicamente un 27,3% del ACV inicial permanece retenido en el interior de los liposomas al cabo de 24 horas, es decir que la formulación liposomal no es estable.

- 25 **Ejemplo 9:** Encapsulación de ACV en liposomas LUV de composición POPC:DPPG.

Se preparan liposomas según lo descrito en el Ejemplo 7, sustituyendo los lípidos por POPC y DPPG en relación molar 9:1.

- 30 La cuantificación de ACV encapsulado se realiza siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 7, comprobándose que empleando una mezcla que contiene un PL neutro insaturado, únicamente un 38,1% del ACV inicial permanece retenido en el interior de los liposomas al cabo de 24 horas.

Ejemplo 10: Encapsulación no estable de ACV en liposomas LUV de composición DPPC:COL.

Se preparan liposomas según lo descrito en el Ejemplo 7, sustituyendo los lípidos por DPPC y colesterol en relación molar 6:4. La determinación de ACV encapsulado se realiza siguiendo la metodología descrita en el Ejemplo 7, comprobándose que utilizando una mezcla de lípidos que no contiene un PL saturado con carga, únicamente un 25,4% del ACV inicial permanece retenido en el interior de los liposomas al cabo de 24 horas.

Ejemplo 11: Encapsulación de IDUR en liposomas MLV de composición DSPC:DSPG.

Se añaden a un matraz de rotavapor DSPC y DSPG en una relación molar 9:1 y cloroformo: metanol en una relación 2:1 v/v. Una vez disueltos los lípidos en la mezcla de solventes, el matraz se conecta al rotavapor, ajustando la temperatura del baño a 40 °C, y se evapora el disolvente a presión reducida (800 mbar) hasta formar una película de lípidos en las paredes del matraz. Posteriormente se reduce la presión a 100 mbar y se mantiene durante 1 hora. Finalmente, el matraz se retira del rotavapor y se liofiliza durante toda la noche para eliminar posibles trazas de disolvente orgánico. La película de lípidos así formada se hidrata por agitación con 50 ml de una solución acuosa de iododeoxiuridina (2 mg/ml) a 65°C durante 1 hora en el rotavapor.

La suspensión liposómica formada se extruye a través de filtros de policarbonato de 2 µm de poro para homogeneizar el tamaño de las vesículas formadas. Finalmente, el fármaco no encapsulado se elimina mediante diafiltración frente a 6 volúmenes de un tampón fosfato salino (pH 6; 150 mM NaCl), empleando para ello membranas Vivaflow 50 con un corte de 100KD (Sartorius). Los liposomas resultantes se diluyen con el mismo tampón, se alicuotan en viales de polipropileno y se almacenan a 25 °C hasta su análisis.

Para determinar el IDUR total presente en la suspensión liposómica, primero se disuelven los lípidos de la membrana liposómica y se libera su contenido mediante dilución de la suspensión en metanol. Luego se determina la concentración de IDUR mediante espectroscopia a 284 nm frente a una curva de calibración.

Para determinar el IDUR encapsulado, se sedimentan previamente los liposomas mediante centrifugación durante 25 minutos a 26.000 g, recogiendo el sobrenadante. Posteriormente se analiza el contenido de IDUR en el sobrenadante por el procedimiento anteriormente descrito.

La diferencia entre el IDUR total y el presente en el sobrenadante representa la fracción encapsulada. En el ejemplo descrito, la concentración de IDUR total se ajustó a 0,555 mg/ml, estando un 97,8 % del mismo encapsulado en el interior de los liposomas al comienzo del estudio. La relación molar IDUR/lípido fue de 0,04.

La Figura 7 muestra la evolución del porcentaje de IDUR encapsulado (expresado en porcentaje respecto al inicial) a lo largo de 2 meses a 25 °C, no detectándose ninguna caída significativa. Se comprueba entonces que empleando una combinación de PLs saturados neutros y saturados con carga se obtienen formulaciones liposomales estables de IDUR.

B- DIFUSIÓN EN PIEL

Ejemplo 12: Penetración cutánea y relación dosis respuesta de 5-FU liposomal.

Se preparan liposomas de acuerdo al Ejemplo 5 con los cuales se obtienen tres diluciones diferentes utilizando un tampón fosfato salino pH 6,2 hasta tener un contenido total de 5-FU de 1,2%, 0,9% y 0,4%, respectivamente. El porcentaje de 5-FU encapsulado es del 41%.

Con cada una de las tres concentraciones se realizan experimentos de difusión tal y como se describe a continuación, durante 24 horas. Cada muestra de liposomas se analiza en 8 experimentos diferentes.

Los estudios de difusión se realizan utilizando piel de oreja de cerdo dermatomizada a 1 mm, montadas en celdas de difusión automáticas de Franz (Hanson Research), con una superficie total de difusión de 0,636 cm². El receptor de cada una de las celdas de difusión se llena con 4,5 ml de tampón fosfato y se mantiene a 37°C con una agitación de 300 rpm. En la superficie de la piel se aplican 10 µl de la suspensión liposómica. Pasado el tiempo establecido para la difusión, las celdas se desmontan, se lava extensamente la superficie de la piel para eliminar los restos de suspensión liposómica. Una vez lavadas, las pieles se secan y se congelan embebidas en Tissue-

Tek (Bayer) y se montan en criostato (CM-1900, Leica). Se obtienen cortes
secuenciales de 40 μm paralelos a la superficie de la piel. El 5-FU presente en los
cortes de piel se extrae durante 15 minutos con 300 μl de agua a 50°C.
Posteriormente las muestras se centrifugan (10 minutos 8000 rpm; Centrifuge 5804R,
5 Eppendorf) y se filtran (0,45 μm) para su análisis por HPLC.

El análisis del contenido de 5-FU en las muestras de procedentes del compartimiento
receptor y de los cortes de piel se realiza por HPLC (cromatógrafo HP1100 con
detector UV-visible HP1100; Hewlett-Packard), utilizando las siguientes condiciones
10 cromatográficas:

- Columna Kromasil C₁₈ (240x4) 5 μm
- Precolumna ODS
- Filtro de precolumna
- 15 -Fase móvil: K₂HPO₄ 0,01 M (pH = 3) : Metanol (98:2)
- Flujo = 1 ml/min
- Temperatura = 35°C
- Detección = 266 nm
- Volumen de inyección = 100 μl

20

La figura 8 muestra la concentración de 5-FU en los diferentes estratos de la piel.
Las primeras 80 μm corresponden al estrato córneo, entre la 80 y 200 se encuentra la
epidermis y por debajo, la dermis (Jenning, V., Gysler, A., Schäfer Korting, M.,
Gohla, S.H. Eur. J. Pharm. Biopharm., 49. 211-218 (2000)).

25

Se observa una clara penetración del 5-FU en todos los estratos de la piel analizados,
con un evidente efecto dosis-respuesta.

Ejemplo 13: Penetración cutánea de ACV liposomal y comparación con ACV en
30 solución.

Se preparan liposomas de acuerdo al Ejemplo 7 y se ajusta la suspensión resultante
hasta una concentración de ACV de 1 mg/ml. Simultáneamente se prepara una
solución de referencia de ACV de 1 mg/ml en el mismo tampón que los liposomas.
35 Tanto la suspensión de liposomas como la solución de ACV de referencia se ensayan
en pruebas de difusión en piel tal y como se describe a continuación.

Los ensayos de difusión se realizan en un equipo de flujo continuo con células PermeGear ILC-07 de 0,69 cm² de superficie, utilizando piel dorsal de ratones sin pelo (SKH1). A efectos de estandarizar los datos, se utiliza una concentración fija de ACV de 1 mg/ml, diluyendo para ello adecuadamente las suspensiones de liposomas preparadas según el ejemplo 2. Como referencia se utiliza una solución de ACV en el mismo tampón. Todas las pruebas se realizan disponiendo 200 µl de la solución o suspensión liposomal en la célula donadora.

Las muestras de piel de los ratones, una vez eliminada la grasa subcutánea, se montan en las celdas de difusión. Como líquido receptor (en contacto con la dermis) se utiliza tampón fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6. El tampón termostatzado a 37°C se circula en la cámara de difusión a un flujo constante de 0,5 ml/h. Todas las muestras se hidratan durante un mínimo de 1 hora antes del comienzo de la difusión, que procedió por un total de 18 horas. Pasado ese tiempo, las membranas de piel se lavan 3 veces con tampón fosfato isotónico pH 6, y se secan cuidadosamente con una punta de algodón. Se analiza el ACV presente tanto en piel completa y como en epidermis. Para esto último, una vez realizada la difusión, las membranas de piel se lavan y secan como se ha descrito y el estrato córneo se elimina aplicando y retirando 10 veces consecutivas sendas tiras de cinta adhesiva sobre la superficie de la piel.

Una vez lavadas y cortadas, las muestras de piel o epidermis se congelan y descongelan repetidamente en nitrógeno líquido, y se les añade 1 ml de NaOH 0,5 N. La suspensión obtenida se incuba 16 horas a 50°C para su solubilización. Finalizado este tiempo, las muestras se centrifugan retirándose la solución evitando la capa de grasa de la superficie y se filtra por filtros de nylon de 0,2 µm. En este punto las muestras se congelan hasta su procesamiento previo al análisis.

Dicho procesamiento se realiza diluyendo las muestras con NaOH 0,5 N y precipitando las proteínas con HClO₄ 5N. Posteriormente se centrifuga y se recoge el sobrenadante filtrándolo con filtros de nylon de 0,2 µm directamente en viales de inyección de HPLC. El análisis de las muestras se realiza mediante HPLC, utilizando una columna Discovery Amide C16 de 250 x 4,6 mm y partículas de 5µm (Supelco) con la siguientes condiciones cromatográficas:

- Eluyente: Agua
- Flujo: 1,5 ml/min
- Detección: 254 nm

- Temperatura: 27°C
- Volumen de inyección: 50µl

Los resultados se muestran en la Tabla 1, donde se observa que los liposomas según la invención tienen un importante efecto promotor de la difusión del ACV en piel, llegando el ACV encapsulado en ellos a las capas profundas de piel viable más allá del estrato córneo en cantidades entre 3 y 4 veces superiores a las obtenidas con el fármaco en solución.

Tabla 1. Niveles de ACV en piel tras 18 horas de difusión (% dosis aplicada + D.E.)

	N (cada grupo)	ACV liposomal	ACV en solución	Significación de diferencia
Piel completa	12	0,89 ± 0,40	0,21 ± 0,18	P = 0,0131
Epidermis	6	0,37 ± 0,19	0,13 ± 0,7	P < 0,0001

Ejemplo 14: Comparación con una formulación comercial de liberación sostenida de 5-FU.

Se obtienen liposomas de acuerdo al Ejemplo 5 y se prepara una dilución con un contenido total de 5-FU de 0,4 %.

Se realizan pruebas de difusión de acuerdo al método descrito en el Ejemplo 12 con esta preparación y con una formulación comercialmente disponible bajo la marca Carac®, que contiene 0,5% de 5-FU, 2/3 partes del cual está contenido en microesponjas. Está descrito que esta formulación presenta una liberación sostenida de 5-FU. Las pruebas se realizan durante 2, 6, 24 y 72 horas. En todos los casos la cantidad de producto aplicada fue de 10 mg .

Los niveles medios medidos en piel son siempre superiores con la formulación liposómica, siendo estadísticamente significativas a las 24 h en epidermis y dermis. Se observa claro efecto depot de los liposomas, permaneciendo la concentración de 5-FU en epidermis básicamente constante entre las 2 y 24 horas.

Los resultados se muestran en las figura 9, 10 y 11 referidos a estrato córneo, epidermis y dermis, respectivamente.

Ejemplo 15: Irritación dérmica de 5-FU liposomal y comparación con una formulación comercial de 5-FU.

- 5 Se utiliza la suspensión liposómica al 1,2 % de 5-FU descrita en el Ejemplo 6, realizando pruebas de irritación cutánea con esta composición y con una formulación comercialmente disponible bajo la marca Efudix®, con un contenido del 5 % de 5-FU.
- 10 El ensayo de irritación dérmica se realiza siguiendo un procedimiento basado en la guía 404 de la OCDE. Se utilizan tres conejos albinos (neocelandeses) machos (KBL IOPS/SPF; Charles River Ibérica, S.A.) con un peso entre 1,8-2 kg.
- 15 Se alojan en jaulas individuales con acceso ad libitum a dieta estándar y agua. Los animales se mantienen en condiciones controladas de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), fotoperiodo (12/12 horas luz/oscuridad), y humedad relativa (40-60%).
- 20 Una cantidad de 0,5 ml de la suspensión liposómica de 5-FU al 1,2 % descrita en el Ejemplo 6 se aplica tópicamente sobre un área de aproximadamente 6 cm^2 de piel previamente rasurada que seguidamente se cubre con un parche de gasa. A las 4 horas de la aplicación, se retira el parche y se lava la zona de aplicación. Una hora y 24 horas después se observa la zona y se evalúa la irritación producida puntuando de 0 a 4 el grado de eritema y edema, respectivamente. Esta aplicación se repite en la misma zona de piel intacta diariamente, cinco días a la semana, durante un total de 3
- 25 semanas. El mismo procedimiento se sigue con la formulación comercial de 5-FU al 5 %.
- 30 Después de cada aplicación, se obtienen las puntuaciones medias para cada signo de irritación obtenidas en las observaciones realizadas a la hora y a las 24 horas, puntuando por separado de 0 a 4 eritema y edema producidos, y clasificándose el grado de irritación según el sistema de clasificación dermal de la CEE, en el que sustancias que produzcan puntuaciones >2 en edema o en eritema se consideran irritantes.
- 35 En estas condiciones Efudix® ha resultado muy irritante, obligando a la interrupción del tratamiento a la 2ª semana debido a la severidad de la irritación producida. Por el

contrario, la suspensión liposómica ha mostrado ser no irritante durante todo el tratamiento

FORMULACIONES GALÉNICAS

5

Los liposomas de la presente invención pueden ser vehiculizados en distintas composiciones farmacéuticas, algunas de las cuales se exponen a continuación de forma no limitativa.

10

A.- Loción

Suspensión de liposomas	c.s.p. alcanzar dosis deseada de fármaco
Glicerina	50 g
Fosfato disódico	0,044 g
Fosfato monosódico	0,124 g
15 Kathon® CG	0,05 g
Agua	c.s.p. completar formulación

B.- Gel

Suspensión de liposomas	c.s.p. alcanzar dosis deseada de fármaco
20 Carbopol® 980 ¹	0,5 – 1g
Trietanolamina	c.s.p. pH = 6,5
Metilisotiazolinona (Kathon®CG)	0,05 g
Propilenglicol	0,5 g
Glicerina	15 g
25 Agua	c.s.p. completar formulación

En lugar de Carbopol, se puede utilizar otro agente gelificante seleccionado entre Poloxamer 407 en una cantidad entre 15 y 20%, carboximetilcelulosa (CMC) entre 1 y 10%, hidroxietilcelulosa (HEC) entre 1 y 5%, hidroxipropil-metilcelulosa (HPMC) entre 1 y 15%, metilcelulosa (MC) entre 1 y 5% en peso de la formulación, y sus mezclas.

30

Gel de 5-FU liposomal

5- FU	0,4%
35 DSPC	1,2%
DSPG	0,13%

	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,035%
	NaH ₂ PO ₄	0,1075%
	EDTANa ₂	0,1%
	NaCl	0,76%
5	Propilenglicol	2%
	EtOH 96°	2%
	HEC	2%
	Bronopol	0,04%
	Agua	csp 100 %

10

Propilenglicol (PG) puede estar en cantidades entre 1 y 20 %, etanol entre 1 % y 5 %, hidroxietilcelulosa (HEC) entre 1 % y 5 % , bronopol entre 0,01 y 0,1 % en peso de la formulación.

15

En lugar del tampón fosfato Na₂HPO₄·2H₂O / NaH₂PO₄ se pueden utilizar otros sistemas reguladores de pH farmacológicamente aceptables, conocidos por un experto en la materia, en concentraciones habituales. De ser necesario, las cantidades del tampón y de NaCl pueden ser modificadas de forma conocida por un experto en la materia, con la finalidad de conseguir que la formulación sea isotónica.

20

La estructura de los liposomas de acuerdo a la presente invención se mantiene en geles de este tipo, tal como se puede ver en la Figura 12 donde se muestra una fotografía de liposomas DSPC:DSPG en gel de hidroxietilcelulosa 2% obtenida por microscopia electrónica de fractura por congelación (freeze-fracture electron microscopy).

25

C- Solución parenteral

Suspensión de liposomas

Tampón fosfato salino

30

Solución isotónica de cloruro de sodio

REIVINDICACIONES

1. Formulaciones liposomales que comprenden al menos un agente activo hidrofílico encapsulado en liposomas constituidos por al menos una bicapa lipídica formada por una mezcla de al menos un fosfolípido saturado neutro y al menos un lípido saturado con carga.
2. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el fosfolípido saturado neutro es elegido entre derivados de fosfatidilcolina y sus mezclas.
3. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 2 caracterizadas porque el derivado de fosfatidilcolina es seleccionado entre DSPC, DPPC y DMPC.
4. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el lípido saturado con carga negativa es elegido del grupo formado por derivados de fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico y sus mezclas.
5. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 4 caracterizadas porque el lípido saturado con carga negativa es seleccionado entre DSPG, DPPG y PS.
6. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el lípido saturado con carga positiva es SA.
7. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 6 que además pueden contener al menos otro lípido seleccionado entre esteroides y derivados, gangliósidos y esfingomielinas.
8. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 7 caracterizado porque el esteroide es colesterol.
9. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 1 caracterizadas porque el agente activo hidrofílico es un fármaco.

10. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 9 caracterizadas porque el fármaco tiene bajo peso molecular.
- 5 11. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 10 caracterizadas porque el fármaco de bajo peso molecular es seleccionado entre 5-fluorouracilo, aciclovir, iododeoxiuridina, metotrexato y ciprofloxacino
- 10 12. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores que comprenden 5-FU encapsulado en liposomas constituidos por DSPC:DSPG.
13. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 11 que comprenden 5-FU encapsulado en liposomas constituidos por DSPC:PS.
- 15 14. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 11 que comprenden ACV encapsulado en liposomas constituidos por DPPC:COL:DPPG.
- 20 15. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicaciones 1 a 11 que comprenden ACV encapsulado en liposomas constituidos por DSPC:DSPG.
- 25 16. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizadas porque los lípidos de la bicapa se encuentran en una relación molar PLs saturados neutros / lípidos saturados con carga entre 50/50 y 95/5.
17. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 16 caracterizada porque la relación molar PLs saturados neutros / lípidos saturados con carga está entre 80/20 y 95/5.
- 30 18. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones anteriores caracterizadas porque la relación molar agente activo hidrofílico / lípidos está entre 0,01/1 y 40/1.
- 35 19. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 18 caracterizadas porque la relación molar agente activo hidrofílico / lípidos está entre 0,1/1 y 2/1.

20. Formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones 12, 13, 18 y 19 caracterizadas porque la relación molar 5-FU / lípidos está entre 0,2 y 1,5.

5 21. Formulaciones liposomales de acuerdo a la reivindicación 20 caracterizadas porque la relación molar 5-FU / lípidos está entre 0,5 y 1,0.

22. Formulaciones farmacéuticas que contienen formulaciones liposomales de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 23. Formulaciones farmacéuticas de acuerdo a la reivindicación 22 para la administración tópica de agentes farmacológicamente activos.

15 24. Uso de las formulaciones liposomales de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21 en la preparación de un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos del ser humano o animal.

20 25. Uso de acuerdo a la reivindicación 24 en la que la enfermedad o trastorno afecta a piel y/o mucosas.

26. Uso de acuerdo a la reivindicación 25 de una formulación liposomal de 5-FU de acuerdo a las reivindicaciones 12, 13, 16, 17, 20 ó 21 en la preparación de un medicamento tópico para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos hiperproliferativos de la piel y/o mucosas.

25 27. Uso de acuerdo a la reivindicación 25 de una formulación liposomal de ACV de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19 en la preparación de un medicamento tópico para la prevención y/o el tratamiento de infecciones causadas por el virus del herpes en la piel y/o mucosas.

30 28. Procedimiento de preparación de formulaciones liposomales de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 21 que comprende:

- disolver los lípidos en una mezcla de solventes orgánicos;
- eliminar los solventes hasta formar una película de lípidos en las paredes del
- 35 recipiente que los contiene;
- hidratar la película por agitación con una solución acuosa del agente activo;

- si se desea, extrudir la suspensión liposómica formada a través de filtros para seleccionar el tamaño vesicular;
- someter a diafiltración la suspensión resultante frente a una solución tampón;
- si se desea, diluir la suspensión liposómica con una solución tampón.

Fig. 1. Porcentaje de 5-FU encapsulado en liposomas DSPC:DSPG en función del tiempo, con eliminación de 5-FU en fase externa.

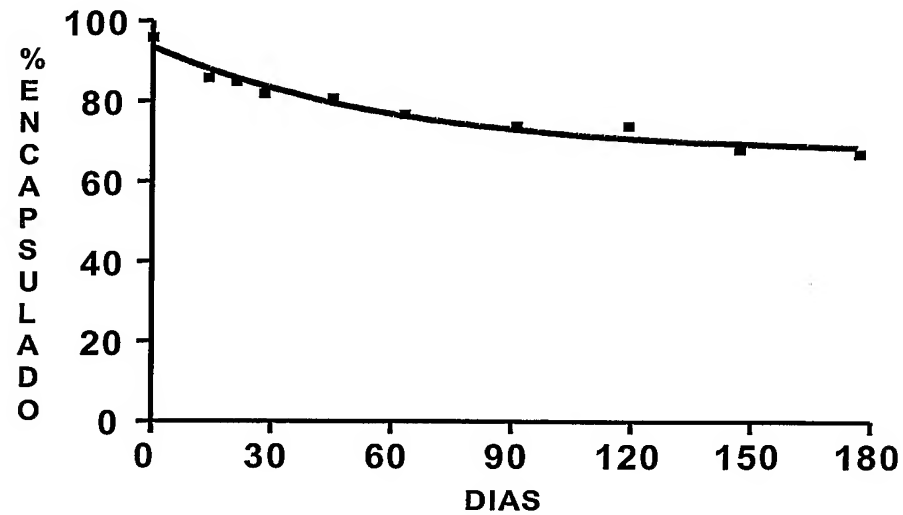


Fig. 2. Porcentaje de 5-FU encapsulado en liposomas DSPC:PS en función del tiempo, con eliminación de 5-FU en fase externa.

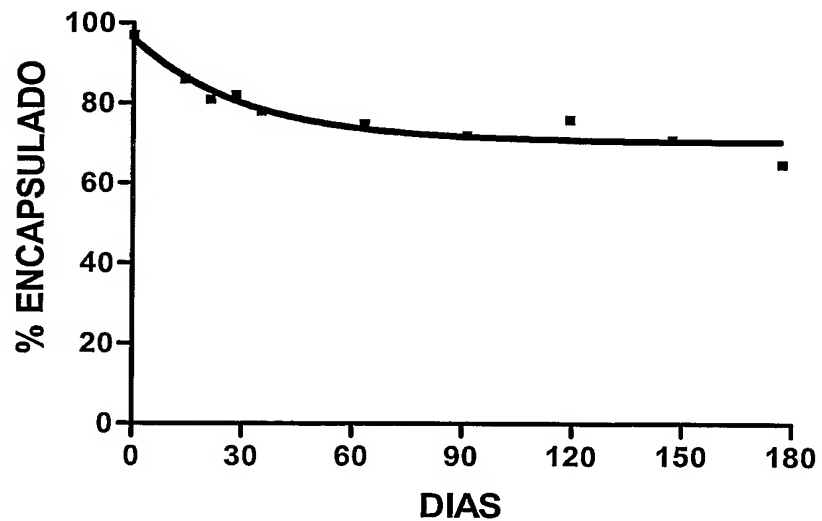


Fig. 3. Porcentaje de 5-FU encapsulado en liposomas DSPC:DSPG en función del tiempo, con eliminación parcial de 5-FU en fase externa.

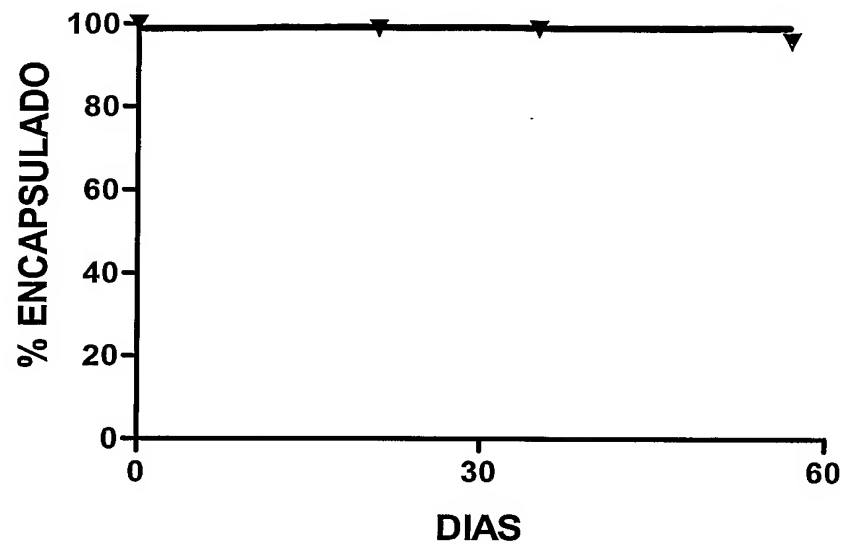


Fig. 4. Porcentaje de 5-FU encapsulado en liposomas DSPC:DSPG en función del tiempo, sin eliminación de 5-FU en fase externa.

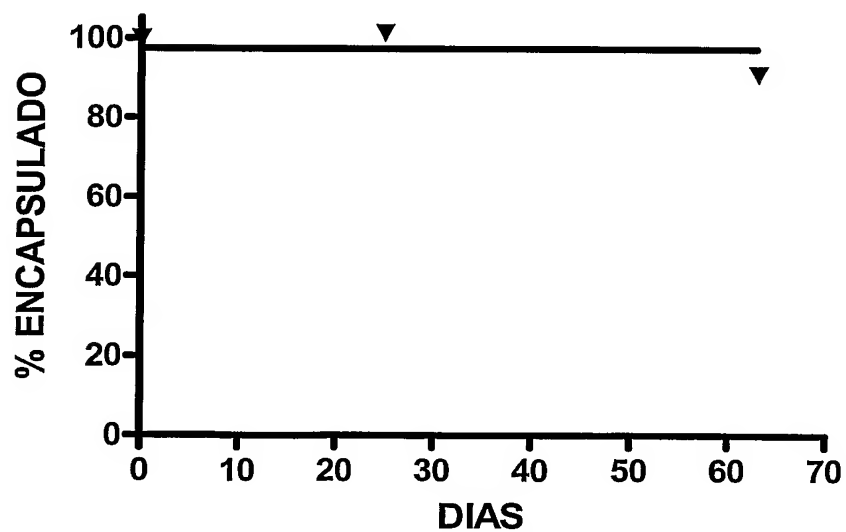


Fig 5. Porcentaje de 5-FU encapsulado en liposomas DSPC:DSPG en función del tiempo, sin eliminación de 5-FU en fase externa.

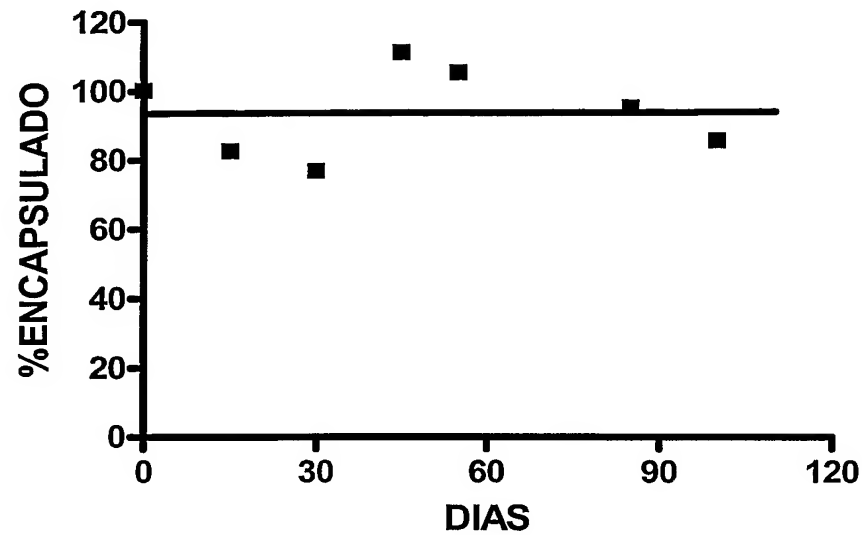


Fig 6. Porcentaje de ACV encapsulado en liposomas DSPC:DSPG en función del tiempo.

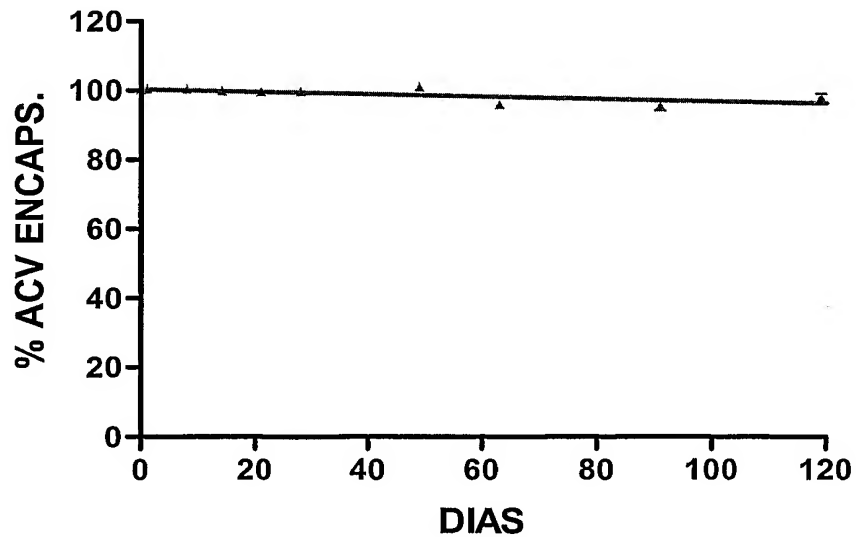


Fig. 7. Porcentaje de IDUR encapsulado en liposomas DSPC:DSPG en función del tiempo.

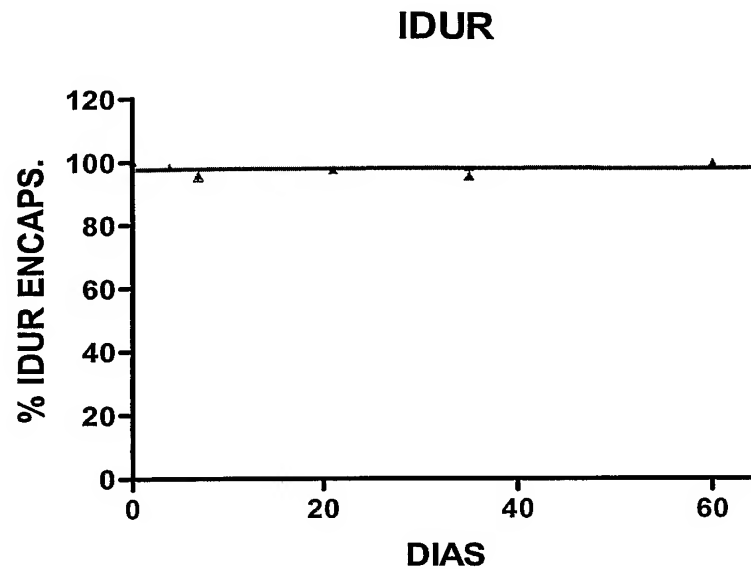


Fig. 8. Concentración de 5-FU en diferentes estratos de piel tras aplicación de distintas suspensiones de 5-FU liposomal.

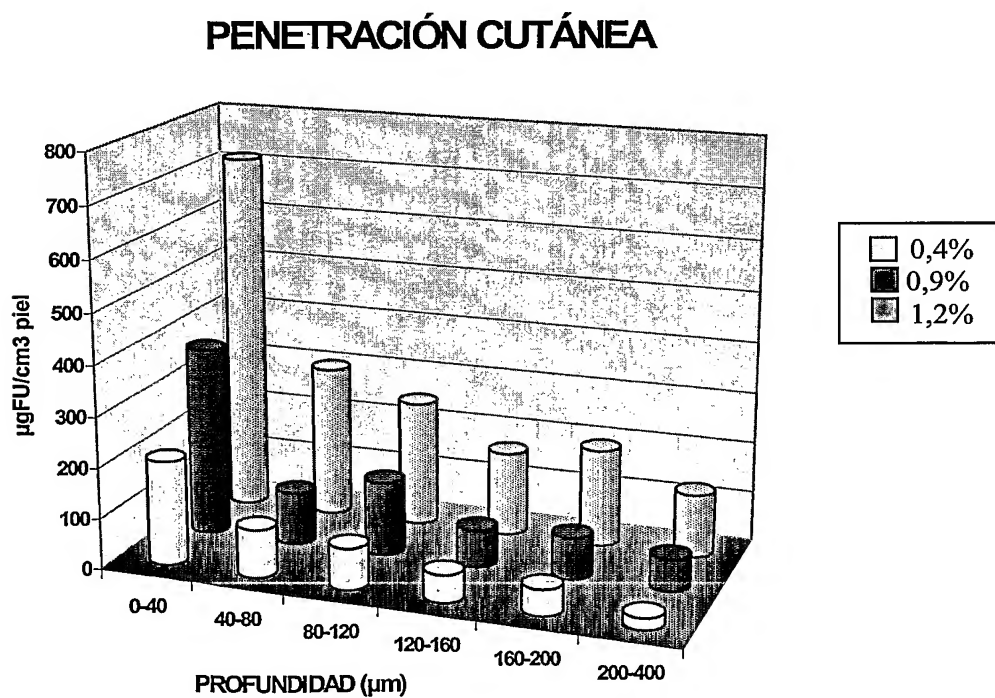


Fig. 9. Concentración de 5-FU en función del tiempo.

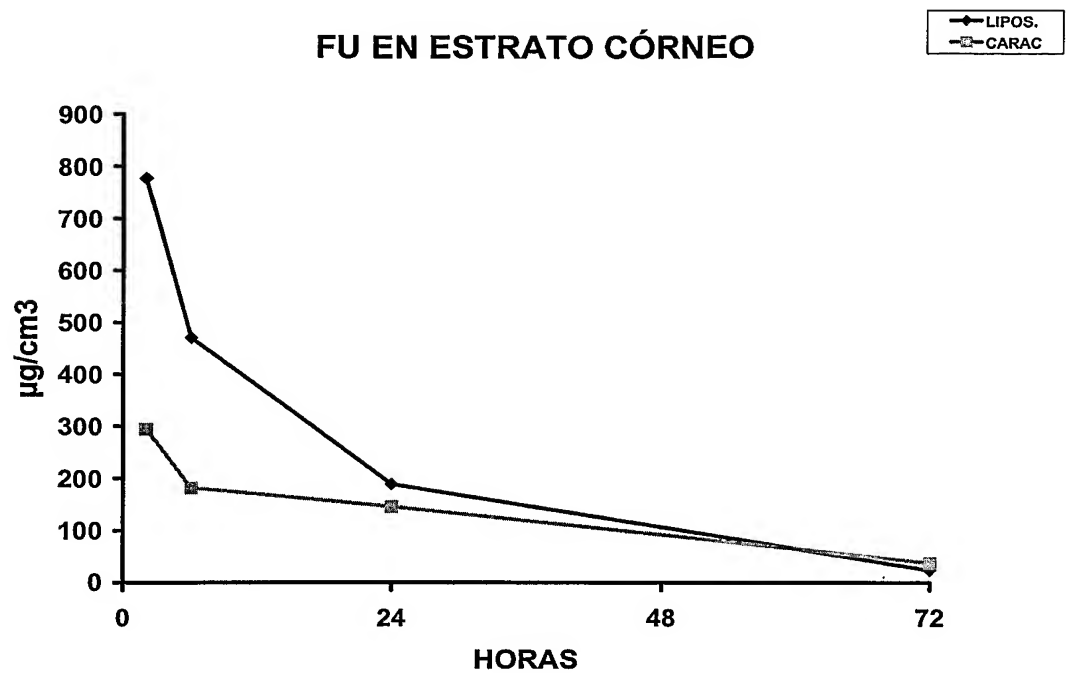


Fig. 10. Concentración de 5-FU en función del tiempo.

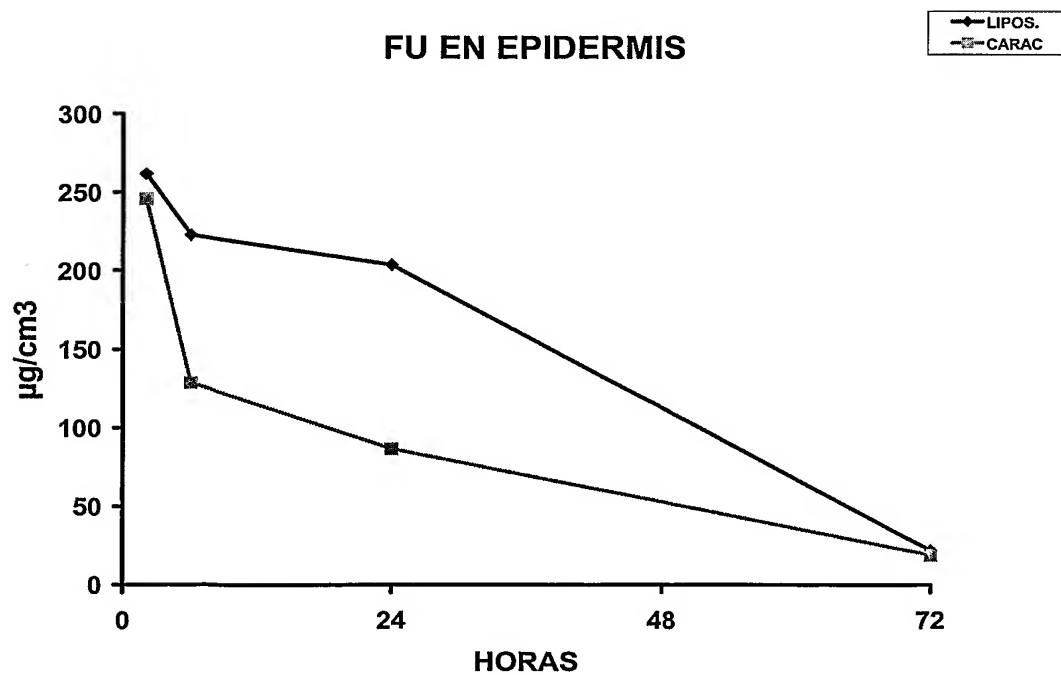


Fig. 11. Concentración de 5-FU en función del tiempo.

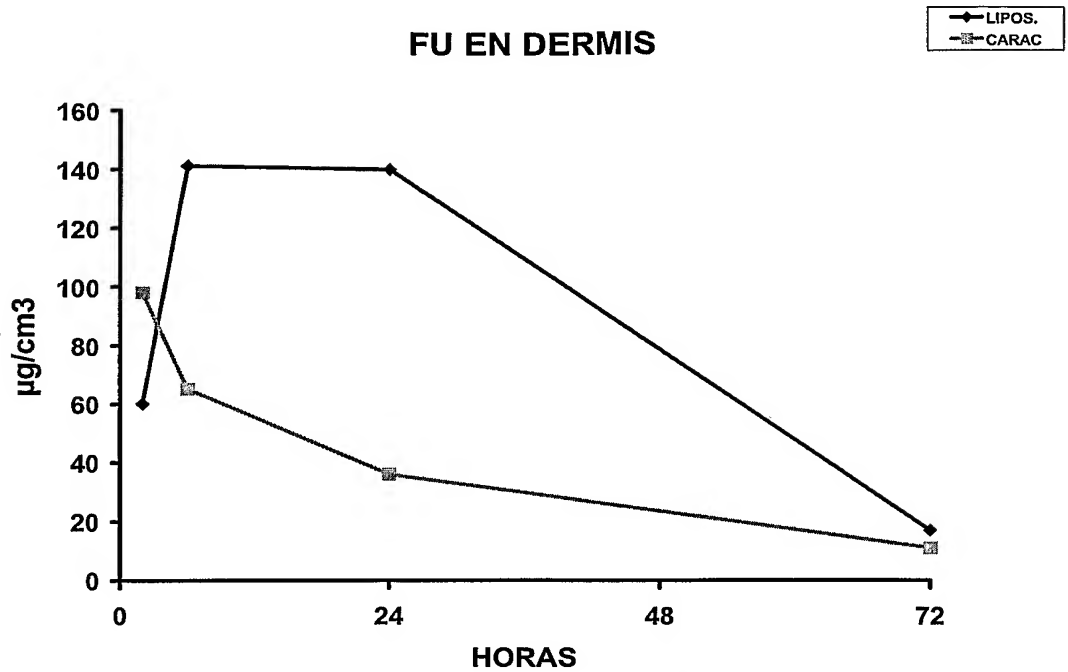


Fig. 12. Fotografía de liposomas DSPC:DSPG en gel de hidroxietilcelulosa



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2005/000171

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC.7 A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC.7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

CIBEPAT, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI,

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRESTA, M. ET AL.: "5-fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties". International Journal of Pharmaceutics, 1993, vol. 99, pages 145-156. pages 145-147, tables 1 and 2.	1-5, 7-11, 16-19, 22-25, 28.
Y		12, 13, 20, 21, 26.
Y	HARRINGTON, K.J. ET AL.: "Liposomally targeted cytotoxic drugs for the treatment of cancer". Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002. vol. 54, pages 1573-1600, table 2.	12, 13, 20, 21, 26.
X	EP 652008 A1 (CANADA MINISTER DEFENCE) 10.05.1995 page 2, line 54-page 3, line 15, claims.	1, 2, 4, 5, 7-11. 16-19, 22-25, 28
X	RAJENDRAN, D. ET AL.: "Comparative evaluation of targeting efficiency of charged and neutral liposomes of 5-fluorouracil". Drug Development and Industrial Pharmacy, 1997, vol. 23, pages 1099-1104, page 1099, table 1.	1, 2, 3, 6-11, 16-19, 22-25.

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22.07.2005

Date of mailing of the international search report

27 JUL 2005

Name and mailing address of the ISA/

SPTO

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/ ES 2005/000171

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0652008 A1	10.05.1995	CA 2101241 A1	24.01.1995
-----	-----	-----	-----
WO03039512 A 1	15.05.2003	none	-----
-----	-----	-----	-----
US 5716638 A	10.02.1998	WO 9535095 A1	28.12.1995
		CA 2193359 A1	28.12.1995
		AU 2977695 A	15.01.1996
		US 5540934 A	30.07.1996
		ZA 9505193 A	24.03.1997
		EP 0804160 A1	05.11.1997
		IL 114229 A	09.05.1999
		AU 4472299 A	28.10.1999
		DE 69512685 D	11.11.1999
		DE 69512685 T	11.05.2000
-----	-----	-----	-----

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2005/000171

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K9/127

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI,

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	FRESTA, M. ET AL.: "5-fluorouracil: various kinds of loaded liposomes: encapsulation efficiency, storage stability and fusogenic properties". International Journal of Pharmaceutics, 1993, vol. 99, páginas 145-156. páginas 145-147, tablas 1 y 2.	1-5, 7-11, 16-19, 22-25, 28.
Y		12, 13, 20, 21, 26.
Y	HARRINGTON, K.J. ET AL.: "Liposomally targeted cytotoxic drugs for the treatment of cancer". Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2002. vol. 54, páginas 1573-1600, tabla 2.	12, 13, 20, 21, 26.
X	EP 652008 A1 (CANADA MINISTER DEFENCE) 10.05.1995 Página 2, línea 54- página 3, línea 15, reivindicaciones.	1, 2, 4, 5, 7-11, 16-19, 22-25, 28
X	RAJENDRAN, D. ET AL.: "Comparative evaluation of targeting efficiency of charged and neutral liposomes of 5-fluorouracil". Drug Development and Industrial Pharmacy, 1997, vol. 23, páginas, 1099-1104. página 1099, tabla 1.	1, 2, 3, 6-11, 16-19, 22-25.

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

22 Julio 2005 (22.07.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

27 JUL 2005 27.07.2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

H. Aylagas Cancio

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 3495475

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2005/000171

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0652008 A1	10.05.1995	CA 2101241 A1	24.01.1995
WO03039512 A 1	15.05.2003	NINGUNO	-----
US 5716638 A	10.02.1998	WO 9535095 A1	28.12.1995
		CA 2193359 A1	28.12.1995
		AU 2977695 A	15.01.1996
		US 5540934 A	30.07.1996
		ZA 9505193 A	24.03.1997
		EP 0804160 A1	05.11.1997
		IL 114229 A	09.05.1999
		AU 4472299 A	28.10.1999
		DE 69512685 D	11.11.1999
		DE 69512685 T	11.05.2000